

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-527562
(P2019-527562A)

(43) 公表日 令和1年10月3日(2019.10.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	4 C O 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-517134 (P2019-517134)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月8日 (2017.6.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月9日 (2019.1.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/087536
 (87) 国際公開番号 WO2017/211313
 (87) 国際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)
 (31) 優先権主張番号 201610405036.7
 (32) 優先日 平成28年6月8日 (2016.6.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 518435932
 常州博嘉生物医▲薬▼科技有限公司
 中華人民共和国 2 1 3 1 2 5 江▲蘇▼省常
 州市新北区黄河西路 2 6 8 号 8 0 9
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人 S S I N P A T
 (72) 発明者 王 少雄
 中華人民共和国上海市浦▲東▼新区半夏路
 1 7 8 号 1 幢 4 楼
 F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24
 CA25 CA44
 4C085 AA13 AA14 BB22 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA10 DA55 DA76
 EA28 FA74
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 長時間作用性 P C S K 9 特異的結合タンパク質及びその応用

(57) 【要約】

本発明は、長時間作用性 P C S K 9 特異的結合タンパク質及びその応用を提供する。本発明が、特有の相補性決定領域を含有する M V 0 7 2 タンパク質、すなわちプロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン 9 型 (PCSK9) と特異的結合する結合タンパク質を提供し、それが、P C S K 9 と特異的に結合でき、かつ有効的に P C S K 9 の機能を障害でき、血漿における L D L コレステロールレベルを低下できる；さらに、前記結合タンパク質の、P C S K 9 機能に関連する、又は P C S K 9 機能に影響される疾患の治療における応用も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

軽鎖可変領域と重鎖可変領域を有する結合タンパク質MV072であって、
その重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 7に示された；
その重鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 8又はSEQ
ID NO: 13に示された；
その重鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 9又はSEQ
ID NO: 14に示された；
その軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10に示された
；
その軽鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 11に示された
；
その軽鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 12に示された
ことを特徴とするPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072。

10

【請求項 2】

(a) その重鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ
に、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9に示され
た；その軽鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、SEQ I
D NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12に示された；又は

20

(b) その重鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ
に、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14に
示された；その軽鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、SEQ
ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12に示された
ことを特徴とする請求項1に記載されたPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV07
2。

【請求項 3】

その重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2又はSEQ ID NO
: 24に示され、その軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4又はSE
Q ID NO: 26に示された；又は

30

その重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 6又はSEQ ID NO
: 28に示され、その軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4又はSE
Q ID NO: 26に示された

ことを特徴とする請求項1また2に記載されたPCSK9特異的結合の結合タンパク質
MV072。

【請求項 4】

その重鎖可変領域が、さらにIgG1Fcと連結することを特徴とする請求項1又は
2に記載されたPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072。

【請求項 5】

上記のIgG1Fcは、QL変異又はYTE変異を有する変異体IgG1Fcであ
ることを特徴とする請求項4に記載されたPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV0
72。

40

【請求項 6】

重鎖可変領域と、IgG1Fcと連結して得たアミノ酸配列は、SEQ ID NO
: 30又はSEQ ID NO: 32に示されたことを特徴とする請求項5に記載された
PCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072。

【請求項 7】

請求項1～6にいずれかに記載されたPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV07
2をコードする核酸。

【請求項 8】

50

請求項 7 に記載された核酸を含む発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載された発現ベクターを含む、或いはそのゲノムに請求項 7 に記載された核酸が組み込まれた宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 にいずれか記載された PCSK9 特異的結合の結合タンパク質 MV072 が、PCSK9 発現又は活性障害に関連する疾患を診断、治療及び / 又は予防する薬品の調製における応用。

【請求項 11】

上記の PCSK9 発現又は活性障害に関連する疾患は、高血清コレステロールレベルに関連する病症を含む；より好ましいのは、高コレステロール血症、冠状動脈心臓病、代謝症候群、急性冠動脈症候群を含む請求項 10 に記載された応用。

10

【請求項 12】

有効量の請求項 1 ~ 6 にいずれか記載された PCSK9 特異的結合の結合タンパク質 MV072 と；薬学的に許容される担体を含むことを特徴とする薬品組成物。

【請求項 13】

キットに請求項 1 ~ 6 にいずれか記載された PCSK9 特異的結合の結合タンパク質 MV072 ；又は請求項 12 に記載された薬品組成物を含むことを特徴とする PCSK9 発現又は活性障害に関連する疾患を治療及び / 又は予防するためのキット。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 にいずれか記載された PCSK9 特異的結合の結合タンパク質 MV072 、及び検出可能なマーカーを含む；より好ましくは、上記の検出可能なマーカーは、蛍光マーカー、発色マーカーを含むことを特徴とする免疫結合体。

20

【請求項 15】

請求項 1 ~ 6 にいずれか記載された PCSK9 特異的結合の結合タンパク質 MV072 ；又は請求項 14 に記載された免疫結合体を含むことを特徴とする PCSK9 レベルの検出に用いられる検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学分野に属し、具体的に、本発明は、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン 9 型 (*Proprotein convertase subtilisin kexin type 9*、PCSK9) 特異的結合タンパク質及びその応用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

心血管疾患は、人の死亡を引き起こす最大の死亡原因である。低比重リポタンパク質コレステロール (*Low-density lipoprotein cholesterol*、LDL-C) は、心血管疾患を引く要因の一つであることは、既の実証された。LDL-C のそんな作用は、相対的に独立で、かつ有効的に制御できる作用であり、過去の 20 年には、スタチン (*statins*) 系脂質降下薬の使用で、心血管疾患の発病率を成功的に低減した。

40

【0003】

しかしながら、スタチン系薬品による治療の方法は、いつも有効なものではなく、別の脂質降下の治療の方法に対する需要がある。一部の患者、特に家族性高コレステロール血症 (*familial hypercholesterolaemia* FH) の患者は、しばしばスタチン系の薬品に対する感受性が低い。最高投与量のスタチン系薬品を使用しても、それらの患者は低い LDL-C レベルを得にくい。また、スタチン系薬品は、筋肉痛及び横紋筋融解などの副作用を有し、一部の患者は、血中脂質レベルを制御するために、スタチン系薬品を使用できない、或いは非常に小さい投与量のスタチン薬品しか使用

50

できない。プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型(PCSK9)阻害剤は、こんな新しい種類の薬品であり、新しい血中LDL-C濃度を制御する選択肢を提供する。

【0004】

PCSK9は、セリンプロテアーゼであり、低比重リポタンパク質受容体(Low-density lipoprotein receptor, LDLR)のレベルの調整に参与する。生体外実験が、PCSK9を加えられたHepG2細胞には、細胞表面のLDLRレベルは、低下したことを実証した。マウス実験によって、PCSK9タンパク質レベルの向上が、肝臓におけるLDLRのタンパク質のレベルを低下できて、同時に、通常のマウスと比べて、PCSK9ノックアウトマウスにおけるLDLRレベルが、ある程度に向上したことを知られる。PCSK9がLDLRと直接に結合し、かつLDLRとともに貪食され、エンドサイトーシス途径に、PCSK9がLDLRと免疫蛍光を共発生することは示された。只今、PCSK9が、細胞外LDLRを分解することを証明する直接的な証拠がない、それが、細胞外LDLRタンパク質のレベルを低下させるメカニズムは、まだ明確ではない。

10

【0005】

研究は、既に、PCSK9がLDLの産生を調節することに機能することを実証した。PCSK9の発現又はそのアップレギュレートは、増加したLDLコレステロールの血漿中レベルに関わり、PCSK9の発現に対する阻害又は欠損は、LDLコレステロールの低い血漿中レベルに関わる。

20

【0006】

したがって、PCSK9活性と、さまざまな治療状況におけるPCSK9が果たした相応な作用とを阻害又は拮抗する、治療によるPCSK9拮抗剤、特にPCSK9特異的結合のモノクローナル抗体の調製は、非常に重要なことである。只今、研究中のPCSK9阻害剤は、大体に、低分子干渉RNA(small interfering RNA、siRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(antisense oligonucleotides、ASOs)、モノクローナル抗体及び、adnectin技術から得られた融合タンパク質のような新しい技術の応用から得られた特異的結合の融合タンパク質を含む。只今、研究しているPCSK9阻害剤は、主にsiRNA類薬品とするRG7652(Alnylam Pharmaceuticals/The Medicines Company)、Adnectin技術による融合タンパク質とするBMS-962476(BMS)、ASO類薬品とするALN-PCS02(Idera Pharmaceuticals)、抗体類薬品とするBococizumab(Pfizer/Rinat)、LGT-209(Novartis)などである。

30

【0007】

しかしながら、動物試験又は臨床研究には、一部のPCSK9モノクローナル抗体類阻害剤は、特異性と親和力にあまり理想的ではない、又は副作用を有するという問題があり、そして、さらに新しい抗PCSK9抗体を最適化と調製する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0008】

本発明の目的は、新しいPCSK9特異的結合タンパク質MV072及びその応用を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一つは、PCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072を提供し、当該結合タンパク質が、軽鎖可変領域と重鎖可変領域を有し、かつ

その重鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:7に示された；

その重鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:8又はSEQ

ID NO:13に示された；

50

その重鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 9又はSEQ ID NO: 14に示されたアミノ酸配列である；

その軽鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10に示された；

その軽鎖可変領域のCDR2のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 11に示された；

その軽鎖可変領域のCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 12に示された。

【0010】

本発明の好ましい例において、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072は：

(a)、その重鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、それぞれに、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9に示された；その軽鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12に示された；又は

(b)、その重鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、それぞれに、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14に示された；その軽鎖可変領域のCDR1、CDR2とCDR3のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12に示されたものから選ばれたものである。

【0011】

別の好ましい例において、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072は、その重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2又はSEQ ID NO: 24、その軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4又はSEQ ID NO: 26に示された；又はその重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 6又はSEQ ID NO: 28、その軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4又はSEQ ID NO: 26に示されたことを特徴とする。

【0012】

別の好ましい例において、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072には、その重鎖可変領域が、更にIgG1Fcと連結する。

別の好ましい例において、上記のIgG1Fcは、変異体IgG1Fcであり、QL変異(SEQ ID NO: 30の融合配列と対応する場合に、相応な変異はT255Q/M433L)を有し、又はYTE変異(SEQ ID NO: 32の融合配列と対応する場合に、相応な変異はM257Y/S259T/T261E)有する。

【0013】

別の好ましい例において、重鎖可変領域とIgG1Fcと連結して得るアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 30又はSEQ ID NO: 32に示された。

別の好ましい例において、上記の結合タンパク質MV072は、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、dAb、Fd、相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(scFv)、二価一本鎖抗体、一本鎖ファージ抗体、二重特異性二本鎖抗体、三重鎖抗体、四重鎖抗体である。

【0014】

別の好ましい例において、上記の結合タンパク質MV072は、モノクローナル抗体である。

別の好ましい例において、上記の結合タンパク質MV072の重鎖可変領域と軽鎖可変領域は、それぞれにSEQ ID NO: 2とSEQ ID NO: 4に示されたアミノ酸配列を有し、又はそれぞれにSEQ ID NO: 6とSEQ ID NO: 4に示されたアミノ酸配列を有し、その重鎖定常領域は、IgG1、IgG2a、IgG2bとIgG3から選ばれた一つの重鎖タイプの定常領域である；かつその軽鎖定常領域は、

10

20

30

40

50

鎖と鎖から選ばれた一つの軽鎖タイプの定常領域である；

本発明のもう一つは、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072をコードする核酸を提供する。

【0015】

本発明のもう一つは、上記の核酸を含む発現ベクターを提供する。

本発明のもう一つは、上記の発現ベクターを含む、或いはそのゲノムに上記の核酸が組み込まれた宿主細胞を提供する。

【0016】

本発明のもう一つは、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072の、PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患を診断、治療及び/又は予防する薬品の調製における応用を提供する。

10

【0017】

好ましい例において、上記のPCSK9発現又は活性障害に関連する疾患は、高血清コレステロールレベルに関連する病症を含むが、それらに限定されない；より好ましくは、高コレステロール血症、冠状動脈心臓病、代謝症候群、急性冠動脈症候群を含む。

【0018】

在本発明のもう一つは、有効量の上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072と、薬学的に許容される担体を含む薬品組成物を提供する。

本発明のもう一つは、PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患を治療及び/又は予防するためのキットを提供し、当該キットは、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072、又は上記の薬品組成物を含む。

20

【0019】

本発明のもう一つは、免疫抱合体を提供し、上記の免疫抱合体は、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072、及び検出可能なマーカーを含む；より好ましくは、上記の検出可能なマーカーは、蛍光マーカー、発色マーカーを含む。

【0020】

本発明のもう一つは、PCSK9レベルの検出に用いられる検出キットを提供し、当該検出キットは、上記のPCSK9特異的結合の結合タンパク質MV072、又は上記の免疫抱合体を含む。

【0021】

本文に開示された内容に基づき、当業者にとって、本発明の他の面は自明なものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、それぞれにヒトPCSK9抗原、マウスPCSK9抗原、カニクイザルPCSK9抗原に対するMV072結合タンパク質、すなわちモノクローナル抗体9M283、9M284の動力学的分析結果を示す図である。

【図2】図2は、MV072結合タンパク質、すなわちモノクローナル抗体9M283、9M284結合タンパク質が、細胞へのLDL吸収を低下する能力を測定する図である。

【図3】図3は、好ましい抗PCSK9抗体の、高脂血症アカゲザル血清LDLのレベルに対する反応を示す図である。群ごとに、7歳を超える雄と雌アカゲザル4匹があり、0日目に皮下注射で、示された投与量のPCSK9の好ましい抗体又は同等の体積の食塩水担体を投与する。示された時点に、血漿サンプルを採取し、血漿LDL量を測定し、0日目の血清LDL量と比較する。

40

【図4】図4は、実施例8の、異なるPCSK9モノクローナル抗体とFcRnの、それぞれにpH6.0とpH7.4におけるELISA結合実験を示す図である。

【図5】図5は、MV072結合タンパク質、すなわちモノクローナル抗体9M284と9M284QLの、それぞれにヒトPCSK9抗原に対する動力学的分析結果を示す図である。

【図6】図6は、MV072結合タンパク質、すなわちモノクローナル抗体9M284、

50

9M284QLと9M284YTE結合タンパク質が、細胞へのLDL吸収を低下する能力を測定する図である。

【図7】図7は、MV072結合タンパク質、すなわちモノクローナル抗体9M284と9M284QLの、それぞれに異なるヒトPCSK9抗原変異体に対する動力学的分析結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

発明者が、広範かつ十分な研究で、特有の相補性決定領域(CDR領域)を含有し、プロタンパク質転換酵素サブチリシンケキシン9型(Proprotein convertase subtilisin kexin type 9、PCSK9)と特異的に結合する結合タンパク質MV072を得、それが、PCSK9と特異的に結合でき、かつ有効的にPCSK9の機能を障害でき、血漿におけるLDLコレステロールレベルを低下し、PCSK9機能に関連する、又はPCSK9機能に影響される疾患の治療に用いられる。

10

【0024】

<結合タンパク質MV072>

本発明が、PCSK9と特異的に結合できる結合タンパク質MV072を提供できる。本発明の結合タンパク質MV072は、完全な免疫グロブリン分子であっても良く、抗原結合断片であっても良い、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab')₂断片、相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(scFv)、ドメイン抗体、二価一本鎖抗体、一本鎖ファージ抗体、二重特異性二本鎖抗体、三重鎖抗体、四重鎖抗体等を含むが、それらに限定されない。

20

【0025】

CDR領域は、免疫学に、注目を集めるタンパク質の配列である。本発明の実施形態において、結合タンパク質は、本明細書に記載された二つ、三つ、四つ、五つ又は全ての六つのCDR領域を含んでもよい。好ましくは、本発明の結合タンパク質MV072が、本明細書に記載された少なくとも二つのCDRを含む。

【0026】

本発明のもう一つは、本明細書に記載された結合タンパク質MV072の機能的なバリエーションを含む。バリエーションが親の結合タンパク質と競合的にPCSK9と特異的に結合できる場合に、当該バリエーション分子を、本発明の結合タンパク質の機能的なバリエーションと見なす。言い換えれば、上記の機能的なバリエーションは、依然として、PCSK9又はその断片と結合できる。機能的なバリエーションは、一次構造配列が基本的に類似するが、例えば親の結合タンパク質に発見されない生体外又は生体内化学及び/又は生物化学的に修飾された誘導体を有するものを含むが、それらに限定されない。こんな修飾は、アセチル化、アシル化、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有付着、脂質又は脂質誘導体の共有付着、架橋、ジスルフィド結合の形成、グリコシル化、ヒドロキシル化、メチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解処理、リン酸化などを含む。言い換えれば、親の結合タンパク質のアミノ酸及び/又はヌクレオチド配列における修飾は、上記のヌクレオチド配列がコードした、又は上記のアミノ酸配列を有する上記の結合タンパク質の結合特性を著しく影響又は変化しない、すなわち上記の結合タンパク質は、依然として、その標的を認識・結合できる。

30

40

【0027】

上記の機能的なバリエーションは、ヌクレオチドとアミノ酸の置換、付加、と欠失を含む保存的な配列修飾を有しても良い。これらの修飾は、本分野の既知の標準技術(例えば標的変異とランダムPCR仲介の変異)から導入でき、かつ天然及び非天然ヌクレオチドとアミノ酸を含んでも良い。

【0028】

保存的なアミノ酸置換は、その中のアミノ酸残基を、類似する構造又は化学性質を有する別のアミノ酸残基に置き換える置換を含む。本分野において、類似する側鎖を有するア

50

ミノ酸残基ファミリーは、既に限定された。それらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖のアミノ酸（例えばアスパラギン酸とグルタミン酸）、非電荷極性側鎖のアミノ酸（例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖のアミノ酸（例えばグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分岐側鎖のアミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香側鎖のアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）を含む。当業者が、上記のファミリー以外の他のアミノ酸残基ファミリーの分類方式も使えることを知るはず。なお、バリエーションは、非保存的なアミノ酸置換（例えばアミノ酸を異なる構造又は化学性質を有する別のアミノ酸残基に置き換える）を有しても良い。類似する小さい変異は、アミノ酸の欠失、又は挿入、又は両方を含んでもよい。本分野によく知られるコンピュータプログラムの使用で、どんなアミノ酸残基が、置換、挿入又は欠失されても免疫学活性を失わないかに関わる指導を発見・確定できる。

10

20

30

40

50

【0029】

機能的なバリエーションは、アミノ末端又はカルボキシ末端又は両方で短縮されたアミノ酸配列を含んでも良い。親の結合タンパク質と比べて、本発明の機能的なバリエーションは、同じまたは異なる、より高い又はより低い結合親和性を有しても良いが、依然として、PCSK9又はその断片と結合できる。例えば、親の結合タンパク質と比べて、本発明の機能的なバリエーションは、PCSK9又はその断片に対して、増加又は低減された（好ましくは増加）結合親和性を有しても良い。好ましくは、可変領域（フレームワーク領域、高度可変領域又はCDR領域を含むが、それらに限定されない）のアミノ酸配列は修飾される。一般的に、軽鎖と重鎖可変領域は、三つのCDR、及びより保存的な領域、すなわちいわゆるフレームワーク領域（FR）を含む三つの高度可変領域を含む。高度可変領域は、CDR由来のアミノ酸残基と、高度可変リングのアミノ酸残基を含む。本発明の範囲内の機能的なバリエーションと、本明細書に記載された親の結合タンパク質は、少なくとも約50%乃至約99%、好ましくは少なくとも約60%乃至約99%、より好ましくは少なくとも約70%乃至約99%、更に好ましくは少なくとも約80%乃至約99%、特に好ましくは少なくとも約90%乃至約99%、最も好ましくは少なくとも約95%乃至約99%、及び最も特に好ましくは少なくとも約97%乃至約99%のアミノ酸配列同一性を有する。当業者が既知したコンピュータアルゴリズム（例えばGap又はBestfit）は、アミノ酸配列を最適に配列して、アラインメントを行い、類似又は同じのアミノ酸残基を判明することに用いられる。機能的なバリエーションは、本分野に既知された一般的な分子生物学方法の使用で、親の結合タンパク質又はその一部分を変えて得られる；上記の方法は、エラープロードPCR、オリゴヌクレオチド指定突然変異導入、部位特異的変異導入及び重鎖及び/又は軽鎖に対するシャフリングを含むが、それらに限定されない。

【0030】

本発明の好ましい形態として、上記の結合タンパク質MV072は、モノクローナル抗体である。抗体の抗原結合特性は、重鎖と軽鎖可変領域に位置する3つの特定の区域（相補性決定領域（CDR）という）で表現でき、上記のCDR領域が、可変領域を4つのフレームワーク領域（FR）に分け、4つのFRのアミノ酸配列は、比較的保存的なもので、結合反応と直接に関与しない。それらのCDRが、リング状の構造に形成し、それらの間のFRに形成されたシートを通じて、空間構造で互に近づき、重鎖におけるCDRと、対応する軽鎖におけるCDRとが、抗体の抗原結合サイトを構成する。本発明の抗PCSK9モノクローナル抗体のCDR領域は、新しいものであって、既存の抗PCSK9抗体と異なる。

【0031】

本発明のモノクローナル抗体は、全てヒト由来であって、低い免疫原性と高い安全性の特徴を有する。

本発明の好ましい形態として、本発明の結合タンパク質MV072は、IgG Fcと融合したタンパク質であっても良い。より好ましくは、上記のIgG1 Fcは、変異体I

g G 1 F c であって、T 2 5 5 Q / M 4 3 3 L 変異又は M 2 5 7 Y / S 2 5 9 T / T 2 6 1 E 変異を有する。発明者らが、酸性条件において、このように改造されて得た結合タンパク質と、抗体の回収と再利用を担当する F c R n との結合は、著しく向上する (E C 5 0 値が著しく低下する) ことを見出した ; これは、当該 I g G 1 F c 変異の M V 0 7 2 結合タンパク質は、生体内にエンドソーム (E n d o s o m e) に分解されにくいことを予測した ; その生体内の半減期が、もっと長くなりつつ、M V 0 7 2 結合タンパク質と抗原との結合能を持ちつづける。

【 0 0 3 2 】

本発明のもう一つは、本発明の少なくとも一種の結合タンパク質、その機能的なバリエーション又は免疫抱合体をコードする核酸分子を提供する。こんな核酸分子は、クローンための中間体として用いられても良く、例えば、以上に記載された親和性成熟方法に用いられる。一つの好ましい実施形態において、上記の核酸分子は、分離又は精製されたものである。D N A 分子の配列は、通常の技術、又はハイブリドーマ技術で得られる。

10

【 0 0 3 3 】

関わる配列を得ると、組換え方法で、大量に関わる配列を得られる。通常に、それをベクターにクローン化され、細胞にトランスフェクションし、その後、通常の方法で、増殖した宿主細胞から、関わる配列を分離して得る。

【 0 0 3 4 】

また、特に断片の長さが短い際に、人工合成の方法で、関わる配列を合成しても良い。通常に、まず複数の小さい断片を合成し、その後それらを連結し、長い配列の断片を得る。

20

【 0 0 3 5 】

只今、もう完全の化学合成で、本発明の結合タンパク質 M V 0 7 2 (又はその断片、又はその誘導体) をコードする D N A 配列を得られる。その後、当該 D N A 配列を本分野に既知された既存の各 D N A 分子 (又はベクター) と細胞に導入しても良い。また、化学合成で、変異を、本発明の結合タンパク質の配列に導入しても良い。

【 0 0 3 6 】

本発明は、さらに、上記の適当な D N A 配列及び適当なプロモーター又は制御配列を含むベクターに関する。これらのベクターは、タンパク質を発現できるように、適当な宿主細胞の形質転換に用いられる。好ましくは、本発明のベクターは、例えば、ウイルスプロモーターを含むプラスミド発現ベクターであり、かつ上記の発現ベクターには、それぞれに、抗 P C S K 9 モノクローナル抗体重鎖可変領域 (V H) と定常領域の I g G 2 (ヒト化 I g G 2 由来の定常領域) 融合配列、及び軽鎖可変領域 V L と人体 I g L a m b d a (ヒト化 I g l a m b d a 由来の定常領域) 融合配列が挿入される。

30

【 0 0 3 7 】

宿主細胞は、細菌細胞のような原核細胞であっても良く、または酵母細胞のような下等真核細胞であっても良く、または哺乳動物細胞のような高等真核細胞であっても良い。代表の例としては、大腸菌、ストレプトマイセス属のような細菌細胞 ; ネズミチフス菌 ; 酵母のような真菌細胞 ; 植物細胞 ; ショウジョウバエ S 2 または S f 9 のような昆虫細胞 ; C H O、C O S 7、N S O または B o w e s メラノーマ細胞のような動物細胞がある。本発明に好適な宿主細胞は、真核宿主細胞であって、特に、C H O 細胞、2 9 3 細胞のような哺乳動物細胞である。

40

【 0 0 3 8 】

必要に応じて、その物理・化学・他の特性を利用し、様々な分離方法で、組換え結合タンパク質を分離や精製しても良い。それらの方法は、当業者がよく知られるものである。それらの方法の例は、通常のリフォールディング処理、タンパク質沈殿剤での処理 (塩析方法)、遠心分離、浸透での細胞破壊、超音波処理、超遠心分離、モレキュラーシーブクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) と他の各液体クロマトグラフィー技術及びそれらの方法の組み合わせを含むが、それらに限定されない。

50

【 0 0 3 9 】

<薬品組成物

本発明の結合分子は、PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患を診断、治療及び/又は予防する薬品組成物の調製に用いられる。

【 0 0 4 0 】

上記の「PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患」は、高血清コレステロールレベルに関連する病症を含む。好ましくは、上記の「PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患」は、高コレステロール血症、冠状動脈心臓病、代謝症候群、急性冠動脈症候群及び関連病症を含むが、それらに限定されない。上記のPCSK9機能とは、PCSK9の関与が必須し、又はPCSK9に激化又は増強されたいずれかの活性及び機能を指す。上記のPCSK9モノクローナル抗体は、さらにPCSK9を検出と定量化し、様々な診断目的に用いられる。

10

【 0 0 4 1 】

本発明の新発見に基づき、さらにPCSK9発現又は活性障害に関連する疾患を診断、治療及び/又は予防できる薬品組成物を提供し、それは、有効量の本発明に記載された結合分子、及び薬学的に許容される担体を含む。

【 0 0 4 2 】

本明細書に用いられる用語「薬学的に許容される」とは、分子自身と、その組成物が、適当に動物又は人に投与される際に、副作用、アレルギーまたは他の有害反応を生じないことを意味する。本明細書に用いられる「薬学的に許容される担体」は、本発明の結合分子と調和でき、すなわち、通常の場合にそれと混ぜ合わせても、組成物の効果を大幅に低下することがない。

20

【 0 0 4 3 】

薬学的に許容される担体又はその組成物とするいくつかの物質の具体的な例はラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよびメチルセルロースなどのセルロース及びその誘導体；トラガカントゴム粉末；モルト；ゼラチン；タルク；ステアリン酸およびステアリン酸マグネシウムなどの固体潤滑剤；硫酸カルシウム；ピーナツ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびココアバターなどの植物油；プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；アルギン酸；Twee n (などの乳化剤；ラウリル硫酸ナトリウムなどの湿潤剤；着色剤；調味剤；圧縮錠剤、安定剤；抗酸化剤；防腐剤；パイロジェンフリー水；等張食塩水；およびリン酸塩緩衝液などである。

30

【 0 0 4 4 】

本発明の薬品組成物は、必要に応じて、各製剤に調製されても良く、かつ医師が患者のタイプ、年齢、体重、および大体的な疾患状態、投与方式などの因子に従って決定した患者に有益な投与量で投与できる。投与方式は、例えば注射又は他の治療方式を採用しても良い。

【 0 0 4 5 】

本発明の結合分子は、分離されない又は分離された形式で使用されても良い。また、本発明の結合分子は、単独で応用されても良く、又は少なくとも一つの本発明の結合分子（又はそのバリエーション又は断片）の混合物に含まれる状態で応用されても良い。言い換えれば、上記の結合分子は、組み合わせられてもよく、例えば、二つ又はそれ以上の本発明の結合分子、そのバリエーション又は断片を含むの薬品組成物として応用されてもよい。例えば、異なる相補性活性を有する結合分子を、一つの治療方案に組み合わせ、所望の予防、治療又は診断作用を達成しても良いが、同じ活性を有する結合分子を一つの治療方案に組み合わせ、所望の予防、治療又は診断作用を達成しても良い。

40

【 0 0 4 6 】

本発明の結合分子又は薬品の組み合わせは、ヒトに使用する前に、適切な動物モデル系で測定できる。こんな動物モデル系は、マウス、サルを含むが、それらに限定されない。

50

本発明の結合分子の適当な投与量の範囲は、例えば、0.001 - 100 mg / kg 体重、好ましくは、0.01 - 15 mg / kg 体重である。また、例えば、一回の注射で投与しても良く、時間の経過とともに投与量を複数回に分けて投与しても良く、又は治療状況の緊急性に応じて、比例して投与量を低減又は増加しても良い。本発明の分子と組成物は、好ましくは無菌なものである。それらの分子と組成物を無菌化する方法は、本分野によく知られることである。診断、予防及び/又は治療に使用する他の分子は、本発明の結合分子と類似する投与方案で投与されても良い。単独で他の分子を投与すると、本発明の一つ又は複数の結合分子又は薬品組成物を投与する前、同時又は後に、患者に他の分子を投与しても良い。通常に、人患者に対する精確な投与方案は、臨床実験にわたって選べられる。

10

【0047】

本発明に記載された結合分子は、臨床医が使用するために、適当なパッケージングに配置され、キットを製造しても良い。好ましくは、上記のキットには、投与方法を説明するための取扱説明書を含んでも良い。

【0048】

本発明は、さらに血清コレステロールレベルを低下させ、患者の高血清コレステロールレベルに関連する疾患を治療又は予防する方法を含み、上記の方法は、患者に、有効量の本発明の少なくとも一つのモノクローナル抗体を投与することを含む。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体と、LDLRタンパク質の利用率を向上する薬品とを併用投与しても良い。上記のLDLRタンパク質の利用率を向上する薬品は、アトルバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、メバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、シンバスタチンを含むが、二つ以上の上記のLDLRタンパク質の利用率を向上する薬品を選択しても良い。

20

【0049】**免疫抱合体**

一方、本発明は、免疫抱合体を含み、すなわち本明細書に記載された少なくとも一つの結合タンパク質を含みつつ、少なくとも一つの機能性分子（例えば検出可能な部分/物質の分子）も含む。上記の抗体と、上記の機能性分子とは、共有連結、カップリング、付着、架橋等の方式で、抱合体を構成できる。本発明の免疫抱合体は、一つ以上のマーカーを含んでも良い。上記のマーカーが、共有結合を通じて、本発明の結合タンパク質と直接に結合/抱合しても良い。又は、上記のマーカーは、一つ又は複数の連結化合物を通じて、上記の結合タンパク質と結合/抱合しても良い。マーカーと結合タンパク質との結合技術は、当業者によく知られるものである。本発明の免疫抱合体のマーカーは、治療剤であっても良い。

30

【0050】

上記の免疫抱合体は、本発明の抗体及び検出可能なマーカーを含んでも良い。上記の検出可能なマーカーは、蛍光マーカー、発色マーカー；酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出金属及び非放射性常磁性金属イオンを含むが、それらに限定されない。一つ以上のマーカーを含んでも良い。検出及び/又は分析及び/又は診断するための、抗体を標識するマーカーは、使用される特定な検出/分析/診断技術及び/又は方法（例えば、免疫組織化学的染色（組織）サンプル、フローサイトメトリーなど）に依存する。本分野に既知された検出/分析/診断技術及び/又は方法に好適なマーカーは、当業者によく知られるものである。

40

【0051】

また、本発明の人結合タンパク質又は免疫抱合体を、固体支持体に付着しても良く、特に、PCSK9タンパク質又はその断片の生体外免疫測定又は精製に使用しても良い。こんな固体支持体は、多孔性または非多孔性、平面状または非平面状にしてもよい。本発明の結合タンパク質は、精製の便利のために、マーカー配列と融合しても良い。上記のマーカー配列の例は、Hisタグ、ヘマグルチニン（HA）マーカー、mycマーカー又はflagマーカーを含むが、それらに限定されない。又は、一つの抗体は、別の一つの抗体

50

を結合して、抗体のヘテロコンジュゲート (heteroconjugate) を形成しても良い。

【0052】

検出試剤とキット

本発明に記載された結合分子に基づき、便利、快速かつ正確に測定しようとするサンプルにおけるPCSK9レベルを検出する試剤又はキットを調製できる。

【0053】

本明細書に使われたように、用語「測定しようとするサンプル」は、生物学由来の血液及び他の体液サンプル、生検組織サンプルや組織培養物のような固形組織サンプル、又はこれらから発生する細胞又はその後代を含む複数のサンプル種類を総括する。当該用語は、さらに、得られたから任意の方式で処理されたサンプルを含み、例えば、試剤でタンパク質又はポリヌクレオチドのような成分を処理、溶解、又は富化する。

10

【0054】

そして、本発明が、測定しようとするサンプルにおけるPCSK9レベルを検出するための検出キットを提供し、当該キットには、本発明のPCSK9結合分子、又はPCSK9結合分子と検出可能なマーカーとが構成する免疫抱合体を含む。

【0055】

本発明が提供したPCSK9結合分子を得た後に、特異性にPCSK9レベルを検出するための検出キットを、簡便に製造できる。

便利に検出するために、上記のキットには、本発明の結合分子を含み、又はPCSK9結合分子と検出可能なマーカーとが構成する免疫抱合体を含む以外に、さらに他の検出試剤又は補助試剤（発色剤、マーカー、二次抗体、抗抗体、増感剤など）を含んでも良く、上記の補助試剤は、例えばELISAキットに通常に使用された試剤であり、それらの試剤の特性及びそれらの調製方法は、いずれも当業者によく知られるものである。当業者が理解すべきのは、本発明の結合分子をPCSK9認識用試薬として利用する限り、各の変化形式の検出キットは、いずれも本発明に含まれる。

20

【0056】

また、上記のキットには、さらにその中に配置された試剤の使用方法を説明するための取扱説明書を含んでも良い。

本発明が提供した結合分子及び/又はキットを得た後に、複数の免疫学関連方法で、サンプルにおけるPCSK9又はその含有量を検出でき、そして測定しようとするサンプルのドナーに、PCSK9発現又は活性障害に関連する疾患が存在するか否かを確定する。

30

【0057】

以下、具体的な実施例を参照して、本発明をさらに説明する。これらの実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の単なる例示であることが理解されるべく。以下の実施例における特定の条件を特定しない実験方法は、通常に、J. Sambrookら、Guide to Molecular Cloning, Third Edition, Science Press, 2002に記載された通常条件に従って実施され、或いはメーカーが推奨する条件に従って実施される。

40

【実施例】

【0058】

〔実施例1〕

PCSK9モノクローナル抗体の最適化とスクリーニング

要件を満たすPCSK9抗体を探すために、発明者らが、大量の研究とスクリーニングで、全てヒト由来ファージライブラリーから、二つの優れた性能を有するモノクローナル抗体を得た。それらの可変ドメインの核酸配列及びアミノ酸配列は、以下のとおりである：

1、モノクローナル抗体9M284

重鎖可変領域ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1である。

重鎖可変領域アミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2である。

50

重鎖の各CDR領域アミノ酸配列：

HCDR1：AFTFDSFGMH (SEQ ID NO：7)；
 HCDR2：LLWSDGSGEYYADSAKG (SEQ ID NO：8)；
 HCDR3：AMGAIYYYAMDV (SEQ ID NO：9)。

重鎖各CDR領域のヌクレオチド配列：

HCDR1：GCCTTCACCTTCGACAGCTTCGGCATGCAC (SEQ ID NO：15)；
 HCDR2：CTGCTTTGGAGCGACGGCTCCGGCGAGTACTACGCCGACTCCGCTAAGGGC (SEQ ID NO：16)；
 HCDR3：GCGATGGGCGCCATCTACTACTACTACGCCATGGACGTG (SEQ ID NO：17)。

軽鎖ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO：3である。

軽鎖アミノ酸配列は、SEQ ID NO：4である。

軽鎖の各CDR領域アミノ酸配列：

LCDR1：TGTSSNIGNQFVS (SEQ ID NO：10)；
 LCDR2：EYNKRPS (SEQ ID NO：11)；
 LCDR3：GSWDSSLGYSV (SEQ ID NO：12)。

軽鎖の各CDR領域ヌクレオチド配列：

LCDR1：ACCGGCACCTCCTCCAACATCGGCAACCAATTCGTGTCC (SEQ ID NO：18)；
 LCDR2：GAGTACAACAAGCGGCCCTCC (SEQ ID NO：19)；
 LCDR3：GGCTCCTGGGACTCTTCCCTGTCCGGCTATGTG (SEQ ID NO：20)。

【0059】

2、モノクローナル抗体9M283

重鎖ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO：5である。

重鎖アミノ酸配列は、SEQ ID NO：6である。

重鎖の各CDR領域アミノ酸配列：

HCDR1：AFTFDSFGMH (SEQ ID NO：7)；
 HCDR2：LLWSDGSD EYYADSAKG (SEQ ID NO：13)；
 HCDR3：ALGAIYSYYAMDV (SEQ ID NO：14)。

重鎖の各CDR領域ヌクレオチド配列：

HCDR1：GCCTTCACCTTCGACAGCTTCGGCATGCAC (SEQ ID NO：15)；
 HCDR2：CTGCTTTGGAGCGACGGCTCCGACGAGTACTACGCCGACTCCGCTAAGGGC (SEQ ID NO：21)；
 HCDR3：GCGTTGGGCGCGATCTACAGCTACTACGCCATGGACGTG (SEQ ID NO：22)。

【0060】

モノクローナル抗体9M283の軽鎖ヌクレオチドとアミノ酸配列は、9M284の軽鎖ヌクレオチドとアミノ酸配列と同じ、相応する各CDR領域も9M284と同じである。

【0061】

〔実施例2〕

トランスフェクションされた細胞でPCSK9モノクローナル抗体の調製

上記のモノクローナル抗体9M284の重鎖ヌクレオチド配列の両端に、HindIII/NotIサイトを添加し、pCDNA3.1+プラスミドの相応するサイトに挿入した；上記のモノクローナル抗体9M284の軽鎖ヌクレオチド配列の両端に、HindIII/NotIサイトを添加し、pCDNA3.1+プラスミドの相応するサイトに挿

10

20

30

40

50

入した。上記のモノクローナル抗体 9 M 2 8 4 を発現する組換えプラスミドを得た。

【 0 0 6 2 】

上記のモノクローナル抗体 9 M 2 8 3 の重鎖ヌクレオチド配列の両端に、H i n d I I I / N o t I サイトを添加し、p C D N A 3 . 1 + プラスミドの相応するサイトに挿入した；上記のモノクローナル抗体 9 M 2 8 3 の軽鎖ヌクレオチド配列の両端に、H i n d I I I / N o t I サイトを添加し、p C D N A 3 . 1 + プラスミドの相応するサイトに挿入した。上記のモノクローナル抗体 9 M 2 8 3 を発現する組換えプラスミドを得た。

【 0 0 6 3 】

1、一過性トランスフェクション

リポフェクション法で、上記の組換えプラスミドを、懸濁している H E K 2 9 3 細胞に一過性トランスフェクションした。

10

【 0 0 6 4 】

E x p i 2 9 3 E x p r e s s i o n 培地には、37、CO₂ 8%、120rpm 回転速度の条件において、得たトランスフェクション細胞を培養した。

培養された大量のトランスフェクション細胞を、二次遠心分離処理（一回目遠心分離の条件は10min、1000g；二回目遠心分離の条件は30min、10000g）を経て、細胞と細胞破片を除去し、上清を得た。澄んだ上清を、Protein A アフィニティークロマトグラフィーカラムにロードし、三回のリンス（リンス緩衝液は、順に P B 150mM NaCl pH6.5；20mM Na-citrate 1M NaCl pH5.5；20mM Na-citrate pH5.5である）で不純物を除去し、その後、pHリニア勾配溶離方式（開始緩衝液A：20mM Na-citrate pH5.5；標的緩衝液B：20mM Na-citrate pH3.0）で、標的抗体を分離、捕獲した。最後、限外濾過濃縮ステップで、標的抗体を、200mM H E P E、100mM NaCl、50mM NaOAc pH7.0 緩衝液に置換した。

20

【 0 0 6 5 】

2、9 M 2 8 4 を安定に発現する細胞の電気トランスフェクション

構築された、9 M 2 8 4 重鎖（SEQ ID NO：23、それが、SEQ ID NO：24のアミノ酸配列をコードし、リードペプチドを有しない）と、9 M 2 8 4 軽鎖（SEQ ID NO：25、それが、SEQ ID NO：26のアミノ酸配列をコードし、リードペプチドを有しない）を有するプラスミド（合計量20μgのプラスミドDNA）を、 1.0×10^7 宿主細胞 CHO-K1 細胞に混ぜた；当該細胞とプラスミドとの混合液をエレクトロポレーター（Gene Pulser II）に入れ、電圧300V、静電容量950μFの指数関数的減衰波で、細胞とプラスミドとの混合液に対して、電気ショックトランスフェクションを行った。電気トランスフェクションされた細胞とDNAとの混合液を、2mL 宿主細胞基礎培地（EX-CELL（登録商標）Advanced（商標）CHO Fed-batch Medium、Sigma、6mMのL-glutamine、Sigmaを含む）を含む6ウェルプレートに加え、細胞を二酸化炭素インキュベーターに入れ、37°Cで24h培養し、その後、培地を、選択的成長培地（EX-CELL（登録商標）Advanced（商標）CHO Fed-batch Medium、Sigma；Puromycin、20μg/mL、GIBCOと6mM L-glutamine、Sigmaを含む）に変更し、約3週間にわたって、細胞生存性が90%以上に回復するまで圧力スクリーニングを行い、重鎖と軽鎖が組み込まれたCHO-K1ゲノムを含むPool細胞系を得た。細胞生存性が90%以上まで回復した時点で、125mL シェイクボトルにFed-batch培養を行い、培養体積は30mLであり、開始細胞濃度は 0.3×10^6 / mLであった。3日目、5日目、7日目、9日目、11日目と13日目にフィード培地（EX-CELL Advanced CHO feed 1（グルコースを含む）、Sigma）を補充し、かつ細胞密度と生存性をサンプリングテストし、グルコース濃度が3g/Lまで低下した時点で、グルコースを6g/Lまで添加し、生存性が70%以下になる時点で、培養を終了し、かつ抗体濃度を検出した。

30

40

50

【0066】

構築された、9M283重鎖（SEQ ID NO：27、それが、SEQ ID NO：28のアミノ酸配列をコードし、リードペプチドを有しない）と9M283軽鎖（SEQ ID NO：25、それが、SEQ ID NO：26のアミノ酸配列をコードし、リードペプチドを有しない）を含むプラスミドで、同様に9M283を安定に発現する細胞を得た。

【0067】

3、9M284トランスフェクタントを安定に発現する半固体クローンとELISAスクリーニング

抗体濃度が比較に高いPool細胞を選択し、モノクローンのスクリーニングを行い、50-200個Pool細胞を含む細胞懸濁液を、10mL半固体培地（Clone Media CHO Growth A（L-Glnを含む）、Molecular devices）と均一に混ぜた後に、100mmペトリ皿に播種し、37°C、5%CO₂インキュベーターに14日培養し、中等大きさの細胞コロニーを選択し、200μL選択的培地を含む96ウェルプレートに転移し、4-5日培養し、細胞懸濁液を吹き付けて均一に混ぜて、2つの96ウェルプレートに平均に配って、かつそれぞれに新鮮な培地を、200μL培養体系まで補充し、その中、1つのプレートには、正常に液体交換・増幅を行い、液体交換・増幅際に、細胞懸濁液を吹き付けて均一に混ぜて、100μL培地を取って捨て、100μL新鮮な培地を補充し、これによって類推した；もう1つのプレートには、液体交換を行わないまま、10日連続に培養し、細胞の上清を採取し、ELISA検出を行った。OD値によって、細胞株を選択し、増幅とサブクローンスクリーニングを行った。最初のラウンドの半固体スクリーニングから得た好ましい細胞株を、0.5細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレートに播種した。7日後、細胞を観察し、単一細胞クローンが、一定のスクリーニング規模に成長したまで、単一細胞集団だけ存在するウェルを、単一細胞ウェルとして選択した。96ウェルプレートの単一細胞ウェルにおける培養液（適切な希釈を行っても良い）を、コーティングされたELISAプレートに転移し、ELISAスクリーニング分析を行い、TOP 3単一細胞系までスクリーニングし、Fed-Batchで、発現量を確認した。

10

20

【0068】

【実施例3】

PCSK9モノクローナル抗体の生物的分析特性

1、キャピラリー電気泳動（CE-SDS）

LabChip GXIIシステムより、キャピラリー電気泳動を行い、抗体を分析した。結果として、還元と非還元条件において、本発明のPCSK9モノクローナル抗体サンプルのピーク純度百分比と分子量は、表1（非還元条件）と表2（還元条件）に示された。

30

【0069】

【表1】

表1、非還元状態において主ピーク純度

ID #	主ピーク純度% (非還元条件)	分子量 (kDa)
9M283	77.1%	178.66
9M284	77.6%	178.13

40

【0070】

【表 2】

表 2、還元状態において主ピーク純度

ID #	主ピーク純度% (還元条件)	分子量 (kDa)
9M283	35.9%、64.2%	37.32、66.36
9M284	36.1%、63.9%	37.15、66.33

10

【0071】

2、モレキュラーシーブ液体クロマトグラフィー (SE-HPLC)

モノクローナル抗体を、0.2 μm フィルターで濾過し (Thomson、カタログ番号 25535-100)、その後、MabPac SEC-1 カラム (Thermo、カタログ番号 07469620) にロードした。移動相緩衝液は、50 mM リン酸ナトリウム、300 mM 塩化ナトリウムであり、pH 6.2、流速は 0.2 ml/min である。ピーク計算は ChemStation ソフトウェアを使用して統合された。本発明の PCSK9 モノクローナル抗体の主ピークおよびマルチマーピークの百分比は、表 3 に示された。

【0072】

20

【表 3】

表 3、主ピーク純度及びマルチマー分析

ID #	主ピーク純度%	マルチマー純度%
9M283	>99.9%	<0.01%
9M284	98.0%	2.0%

【0073】

3、示差走査熱量測定法でタンパク質の安定性を評価

30

示差走査熱量測定法 (DSC) は、追加する必要があるサンプルと、基準物質との熱量の差を、温度の関数とする測定技術である。示差走査熱量測定法は、複数のタンパク質の特性 (50% タンパク質が変性 (TM) した際の温度 / 融解温度を含む) の測定に使用でき、これはタンパク質の安定性を評価する方法の一つである。

【0074】

検出された抗体を、1 mg/ml の濃度で Nano DSC サンプルルームに入れ、25 から 100 まで 1 /min の速度で昇温した。実施する前に、精確な開始温度を確保するために、サンプルを検出する前に、予め 15 分間にスキャンした。サンプルデータには、緩衝液のみ含むサンプルの値を引いた ; Nano DSC ソフトウェアで Tm を計算した。

40

【0075】

結果は、表 4 を参照。

【0076】

【表 4】

表 4

ID#	T _m (°C)
9M283	63°C、74°C
9M284	67°C、70°C、76°C

【0077】

〔実施例 4〕

抗体の PCSK9 と結合する特性

PCSK9 モノクローナル抗体の、人、マウス又はカニクイザル PCSK9 と結合する能を、Octet Red96 システム (ForteBio) で表示した。抗ヒト IgG Fc (AHC) の動力学バイオセンサ (ForteBio、# 18-5063) を、pH 7.0 のグリシンで予処理した後に、測定緩衝液に浸した。検出しようとする PCSK9 モノクローナル抗体を、10 µg/ml の濃度で AHC バイオセンサに 120 秒間固定した。その後、PCSK9 モノクローナル抗体をロードした AHC バイオセンサを、異なる濃度のヒト PCSK9 抗原 (GeneBank AX127530.1)、マウス PCSK9 抗原 (NCBI NM_153565.2) 又はカニクイザル PCSK9 抗原 (NCBI NM_001112660.1) と緩衝液に浸した。緩衝液とロードされたバイオセンサの間の非特異的結合をテストするために、分析物カラムの最後希釈点には、検出緩衝液しか含まない。80~120 秒の間、抗原と抗体との結合を検出した、その後、120~180 秒の間、解離を発生した。検出緩衝液で、60 秒間のベースラインを確定した。抗 PCSK9 のモノクローナル抗体の親和力曲線は、1:1 に結合する動力学センシング単価結合モデルでフィッティングしたものである。

【0078】

動力学的分析は、図 1 と表 5 に示された。

【0079】

【表 5】

表 5

ロードする サンプルID	サンプルID	KD (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)	Full X ²	Full R ²
9M283	huPCSK9	<1.0E-12	3.99E+05	<1.0E-07	0.024	0.9996
9M284	huPCSK9	<1.0E-12	3.66E+05	<1.0E-07	0.0271	0.9995
9M283	cynoPCSK9	8.00E-11	3.08E+05	2.46E-05	0.0146	0.9995
9M284	cynoPCSK9	<1.0E-12	2.98E+05	<1.0E-07	0.0114	0.9995
9M283	msPCSK9	1.40E-08	3.50E+05	5.10E-03	0.0366	0.999
9M284	msPCSK9	3.00E-09	3.20E+05	9.40E-04	0.0636	0.9983

【0080】

〔実施例 5〕

細胞 LDL 吸収の測定

ヒト HepG2 細胞を、ウェルごとに 5×10^4 個細胞の濃度でブラック透明の 96 - ウェルプレート (Costar) における、10% FBS を補充した DMEM 培地 (Mediatech, Inc) に播種し、37 (5% CO₂) で一夜インキュベートした。PCSK9 と抗体の複合体を形成させるために、20 µg/ml のヒト PCSK9

を、吸収緩衝液（10% FBSを含むDMEM）で希釈した各濃度の抗体又は単独の緩衝液（コントロール）と共に、室温において1時間インキュベートした。細胞上清を除去した後に、PCSK9/抗体混合物を添加し、そして最終濃度が8 µg/mlになるように吸収緩衝液で希釈したDil-LDL（Invitrogen）を添加した。37（5% CO₂）で16~18時間インキュベートした後、PBSで細胞を徹底に洗浄し、TECAN M1000で、554 nm（励起）と571 nm（発射）に、細胞蛍光シグナルを検出した。

【0081】

細胞吸収の測定結果は、図2に示された。要するに、PCSK9モノクローナル抗体のIC50値を測定し、具体的に、6.12 nM（9M283）と5.75 nM（9M284）pMの値を得た（図2）。

10

【0082】

上記の結果としては、本発明の抗原結合タンパク質が、優れた細胞へのLDL吸収を低下させる能力を有する。

【0083】

〔実施例6〕

PCSK9モノクローナル抗体が、高脂血症アカゲザル体内の血中LDLレベルに対する影響

高脂血症アカゲザルにおいて、PCSK9モノクローナル抗体9M284が、非ヒト霊長類動物疾患モデルにおいて体内の血清LDLを低下する効果をテストした。4匹の7歳以上の、高脂血症を有するアカゲザルに、0日目、一回皮下注射の方式で、ベクター（PBS+0.01% Tween20）又は3 mg/kgの投与量の、好ましいPCSK9モノクローナル抗体9M284を注射した。それぞれに、0日目、1日目、3日目、5日目、7日目、9日目、11日目、14日目に、一晩中断食した後に、血清LDLの含有量を分析した。

20

【0084】

結果は、図3を参照。一回注射された3 mg/kg PCSK9モノクローナル抗体9M284は、全ての4匹の動物において、血清LDL（50%及び以上）の大幅低下を引き起こした。

【0085】

同様に、発明者らが、高脂血症アカゲザルにおいて、PCSK9モノクローナル抗体9M283の、体内血清LDLを低下する効果をテストした。結果として、PCSK9モノクローナル抗体9M283が、アカゲザルの血清LDLレベルを著しく低下できる。

30

そして、PCSK9抗体が、非ヒト霊長類動物疾患モデルの血清LDLレベルを低下する。

【0086】

〔実施例7〕

Fcの改造で、PCSK9モノクローナル抗体9M284の生体内の半減期を延長

通常の変異子工学の改造方法で、9M284抗体のVH部分を、酵素消化より、それぞれに二つ又は三つの異なるアミノ酸変異を有するIgG1 Fc（野生型の配列は、例えばGenBank登録番号AAD38158.1）に連結した。

40

【0087】

その中、二つのアミノ酸変異を発生するのは、QL変異であり、QL変異のサイトが、SEQ ID NO:30の融合配列の255位（野生型Fcには、当該サイトはTであるが、変異した後はQ（T255Q）である）と433位（野生型Fcには、当該サイトはMであるが、変異した後はL（M433L）である）に対応する。

【0088】

その中、三つのアミノ酸変異を発生するのは、YTE変異であり、変異サイトが、SEQ ID NO:32の融合配列の257位（変異前はMであるが、変異した後はY（M257Y）である）、259位（変異前はSであるが、変異した後はT（S259T）で

50

ある)、261位(変異前はTであるが、変異した後はE(T261E)である)に対応する。QLとYTEの変異が、pH6.0の酸性条件において、IgG Fcの、エンドソーム(Endosome)における新生児Fc受容体FcRnとの結合力を数倍に増強できるから、エンドソーム(pH酸性条件)において、抗体と、FcRnとの分離の程度は低下され、そして抗体が、再度に血液に放出・回収され(pH7.4の正常生理条件において、抗体が、FcRnと結合しない)、半衰期を延長する効果を達成した。

【0089】

9M284 QLの重鎖配列は、例えばSEQ ID NO:29(ヌクレオチド)とSEQ ID NO:30(アミノ酸)である；

9M284 YTEの重鎖配列は、例えばSEQ ID NO:31(ヌクレオチド)とSEQ ID NO:32(アミノ酸)である。

10

【0090】

〔実施例8〕

ELISAで、異なるFc変異体PCSK9モノクローナル抗体とFcRnとの結合を検出

コーティング液(15 mM Na₂CO₃、35 mM NaHCO₃、pH 9.6)を使用し、標的抗体を10 μg/mLまで希釈した後、100 μL/ウェルの量で96ウェルELISAプレートに添加し、4 時間に一夜インキュベートし、コーティングを行った。コーティング終了した後、pH 7.4のPBSTで、サンプルウェルを4回洗浄し、300 μL/ウェルの4%スキムミルク(PBS、pH 7.4)を添加し、25 時間に2時間インキュベートし、ブロッキングを行った。ブロッキング終了した後、pH 7.4のPBSTで、サンプルウェルを4回洗浄し、PBST (pH 6.0/7.4)に溶解した0.4%スキムミルクでそれぞれに希釈したFcRn(開始濃度 20 μg/mL、2倍勾配希釈、合わせて11個濃度勾配がある)を100 μL/ウェルで添加し、25 時間に1.5時間インキュベートした。インキュベート終了した後、pH 6.0/7.4のPBSTでサンプルウェルを4回洗浄し、0.4%スキムミルク(pH 6.0/7.4)でそれぞれに1/500に希釈したanti-His-Tag-HRPを添加し、25 時間に1時間インキュベートした。インキュベート終了した後、pH 6.0/7.4のPBSTでサンプルウェルを4回洗浄し、かつ100 μL/ウェルのTMBを添加し、発色を行った(発色条件:25 、10~15分間)。発色終了した後、100 μL/ウェルの1M H₂SO₄を添加し、発色反応を終了し、450 nmの吸光値を読んだ(650 nmの吸光度値に基づく減算補正した)。

20

30

【0091】

結果は、表6に示されたように、pH 6.0の条件において、9M284 QLと9M284 YTEの変異体抗体の、FcRnとの結合EC50値は、9M284抗体のFcRnとの結合EC50値より2.8倍に小さい。

【0092】

【表 6】

表 6

サンプル	pH	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
9M284	6.0	71.9
9M284-QL	6.0	25.03
9M284-YTE	6.0	24.32
9M284	7.4	NA
9M284-QL	7.4	NA
9M284-YTE	7.4	NA

10

【0093】

〔実施例 9〕

Fc を改造した長い半減期 PCSK9 モノクローナル抗体の親和力と細胞活性の検出

具体的な実験ステップは、実施例 4 と実施例 5 を参照し、図 5 と表 7 に示されたように、9M284 と比べて、改造された抗体 9M284QL の Fab 領域 (VH と VL を含む) は、変化しないから、長い半減期抗体 9M284QL の、ヒト PCSK9 タンパク質との親和力は、9M284 と基本に一致する。親和力が変化しないから、長い半減期の Fc を改造した PCSK9 抗体 9M284QL、9M284YTE と、一般的な半減期の抗体 9M284 の細胞活性 LDL 吸収実験の比較試験 EC50 も類似し、図 6 と表 8 に示された。

20

【0094】

【表 7】

表 7

ロードする サンプルID	サンプル ID	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Full X ²	Full R ²
9M284	PCSK9	<1.0E-12	5.600E+04	<1.0E-07	4.0327	0.9111
9M284-QL	PCSK9	<1.0E-12	5.850E+04	<1.0E-07	1.5254	0.9616

30

【0095】

【表 8】

表 8

サンプル	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
9M284	4.519
9M284-QL	5.28
9M284-YTE	4.363

40

【0096】

〔実施例 10〕

PCSK9 モノクローナル候補抗体と異なる PCSK9 変異タンパク質との結合能

ヒト PCSK9 タンパク質は、異なる変異体があり、高血脂に関連するヒト PCSK9 変異体は、多くの種類があると報道され、発明者らが、その中から、R218S、R306S、D374H、D374Y のヒト PCSK9 変異体タンパク質を選択し、本発明の P

50

C S K 9モノクローナル抗体と、異なる変異体P C S K 9タンパク質と結合する能力を、Octet Red 96システム (ForteBio) を使用し、以上に記載されたように表示した。動力学的分析は、図7と表9に示されたように、R 3 0 6 S以外に、他のヒトP C S K 9タンパク質変異体の、本発明のP C S K 9モノクローナル抗体 (正常I g Gと長い半減期のI g G形式) との親和力は、いずれも天然ヒトP C S K 9タンパク質と、同じオーダーの大きさであり、ただし、長い半減期のP C S K 9モノクローナル抗体9 M 2 8 4 - Q Lと、P C S K 9 R 2 1 8 S タンパク質との結合能は、9 M 2 8 4抗体より3倍に高い。

【 0 0 9 7 】

【表 9】

10

表 9

ロードする サンプルID	タンパク質 サンプル ID	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	Full X ²	Full R ²
9M284	D374Y	<1. 0E-12	2. 184E+04	<1. 0E-07	3. 2239	0. 9516
9M284-QL	D374Y	<1. 0E-12	2. 967E+04	<1. 0E-07	1. 7388	0. 9624
9M284	D374H	<1. 0E-12	2. 490E+04	<1. 0E-07	1. 9488	0. 9477
9M284-QL	D374H	<1. 0E-12	2. 689E+04	<1. 0E-07	0. 4194	0. 9870
9M284	R218S	<1. 0E-12	1. 139E+04	<1. 0E-07	0. 3261	0. 9693
9M284-QL	R218S	<1. 0E-12	3. 649E+04	<1. 0E-07	1. 0594	0. 9412
9M284	R306S	2. 398E-9	3. 393E+04	8. 139E-05	0. 3701	0. 9880
9M284-QL	R306S	1. 461E-9	3. 180E+04	4. 644E-05	0. 0407	0. 9979

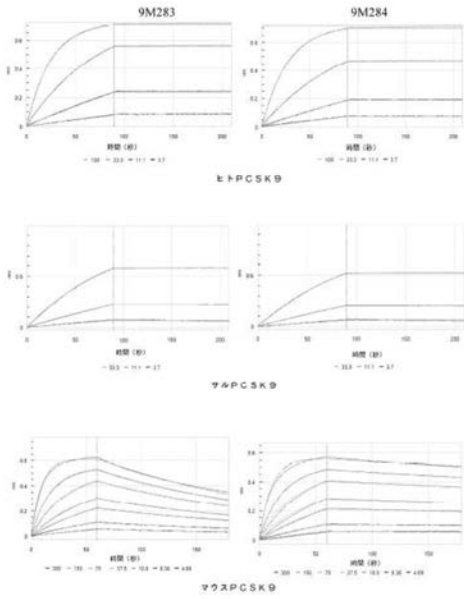
20

【 0 0 9 8 】

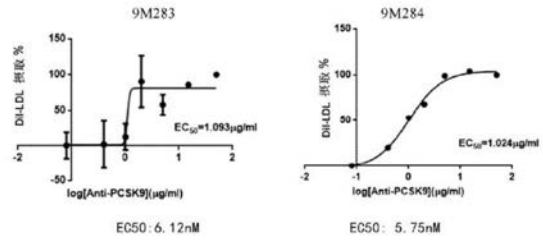
本出願に言及されている全ての参考文献は、参照として単独に引用されるように、本出願に引用されて、参照になる。理解すべきのは、本発明の上記の開示に基づき、当業者は、本発明を様々な変更または修正を行っても良い、これらの同等の形態も本出願に添付された請求の範囲に規定される範囲内に含まれる。

30

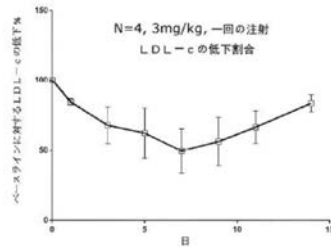
【 図 1 】



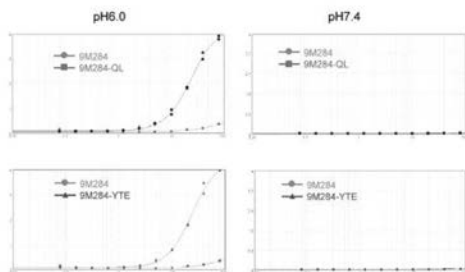
【 図 2 】



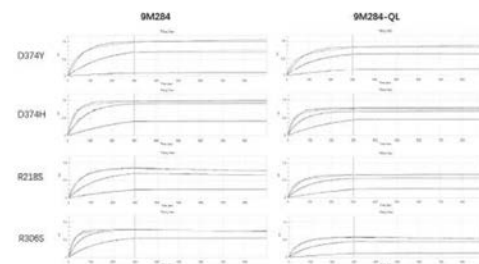
【 図 3 】



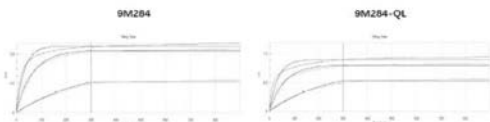
【 図 4 】



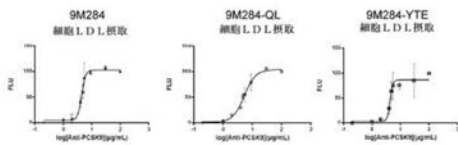
【 図 7 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2019527562000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/087536
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/40 (2006.01) i; C12N 9/64 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 3/06 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, VEN, CNKI, CNABS, ISIWebofKnowledge, Google, PubMed, NCBI, EBI, STN: CHANGZHOU BOJIA PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.; PCSK9, proprotein convertase subtilisin, antibody, heavy chain, light chain, HC, LC, humanized, high cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, LDL, hypolipidemic, cholesterol; WANG, Shaoxiong; SEQ ID NOs: 2, 4, 7-14, 26, 28, 30 and 32		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102245641 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.), 16 November 2011 (16.11.2011), embodiments 1-3, and claims 1-21	1-15
A	CN 101939338 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.), 05 January 2011 (05.01.2011), the whole document	1-15
A	CN 104364266 A (HOFFMANN-LA ROCHE INC.), 18 February 2015 (18.02.2015), the whole document	1-15
A	WO 2015/200438 A1 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.), 30 December 2015 (30.12.2015), the whole document	1-15
A	WO 2014/107739 A1 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.), 10 July 2014 (10.07.2014), the whole document	1-15
A	CN 105461809 A (AKESO BIOPHARMA, INC. et al.), 06 April 2016 (06.04.2016), the whole document	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 03 August 2017 (03.08.2017)		Date of mailing of the international search report 22 August 2017 (22.08.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451		Authorized officer JIN, Chunpeng Telephone No.: (86-10) 62413803

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087536

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102245641 A	16 November 2011	AU 2014262171 B	19 January 2017
		BR PI0922885 A2	04 October 2016
		US 2010166768 A1	01 July 2010
		AU 2009333326 A1	16 June 2011
		IN 201104213 P4	07 September 2012
		JP 2013198487 A	03 October 2013
		VN 10016280 B	25 January 2017
		ES 2613489 T	24 May 2017
		HK 1155180 A0	11 May 2012
		NZ 601923 A	28 March 2013
		KR 20150013359 A	04 February 2015
		KR 1504494 B	20 March 2015
		KR 20110094067 A	19 August 2011
		KR 1699707B B1	25 January 2017
		ID 514885 A	10 November 2011
		EP 2358756 B1	11 January 2017
		EP 3156422 A2	19 April 2017
		EP 3156422 A3	05 July 2017
		EP 2358756 A1	24 August 2011
		MX 341041 B	05 August 2016
		CA 2747123 A1	08 July 2010
		CN 104447997 A	25 March 2015
		CN 102245641 B	07 January 2015
		ZA 201103762 A	25 January 2012
		JP 2012511913 A	31 May 2012
		JP 5902122 B2	13 April 2016
		JP 5318965 B2	16 October 2013
		SG 171377 A1	29 June 2011
		SG 171377 B	11 March 2015
		IL 213050 A	29 January 2015
		TW I465249 B	21 December 2014
		TW 201036633 A	16 October 2010
		US 8062640 B2	22 November 2011
		NZ 593155 A	30 November 2012
		AU 2014262171 A1	27 November 2014
		AU 2009333326 B	26 February 2015
		AU 2009333326 B	11 September 2014
		RU 2015109166 A	10 August 2015
		RU 2552169 C2	10 June 2015
		RU 2011129316 A	20 January 2013
		PH 12011501005 B1	10 September 2015
		MX 2011006197 A	31 July 2011
		ID 201403095 A	28 August 2014
WO 2010077854 A1	08 July 2010		
WO 2010077854 A8	07 July 2011		
VN 28783 A	27 February 2012		
MX 321431 B	26 June 2014		
CN 101939338 A	05 January 2011	AU 2009212282 A1	12 August 2010
		AU 2009212282 B	21 August 2014
		JP 5514743 B2	04 June 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087536

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104364266 A	18 February 2015	JP 2011512129 A	21 April 2011
		US 2009232795 A1	17 September 2009
		US 8957194 B2	17 February 2015
		US 8188233 B2	29 May 2012
		US 2013071379 A1	21 March 2013
		TW 200938631 A	16 September 2009
		EP 2245070 A1	03 November 2010
		EP 2245070 B1	06 August 2014
		CA 2711791 A1	13 August 2009
		IN 201005424 PI	18 November 2011
		WO 2009100318 A1	13 August 2009
		AR 91462 A1	04 February 2015
		MX 2014014830 A	11 May 2015
		US 9266961 B2	23 February 2016
		US 2013344085 A1	26 December 2013
		US 2016355606 A1	08 December 2016
		RU 2015101113 A	10 August 2016
		HK 1205141 A0	11 December 2015
		EP 2861624 A1	22 April 2015
		JP 2015530867 A	29 October 2015
WO 2013188855 A1	19 December 2013		
TW 201410706 A	16 March 2014		
KR 20150023711 A	05 March 2015		
CA 2875096 A1	19 December 2013		
WO 2015/200438 A1	30 December 2015	None	
WO 2014/107739 A1	10 July 2014	None	
CN 105461809 A	06 April 2016	WO 2016127912 A1	18 August 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/087536

A. 主题的分类		
C07K 16/40(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 3/06(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; C12N; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
DWPI, VEN, CNKI, CNABS, ISI Web of Knowledge, Google, PubMed, NCBI, EBI, STN; 常州博嘉生物医药科技有限公司, PCSK9, 前蛋白转化酶枯草溶菌素, 抗体, antibody, 重链, 轻链, HC, LC, 人源化, humanized, 高胆固醇, 低密度脂蛋白胆固醇, LDL, 降血脂, cholesterol, 王少雄, Wang S, SEQ ID NOs: 2, 4, 7-14, 26, 28, 30, 32		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102245641 A (瑞泽恩制药公司) 2011年 11月 16日 (2011-11-16) 实施例1-3, 权利要求1-21	1-15
A	CN 101939338 A (默沙东公司) 2011年 1月 5日 (2011-01-05) 全文	1-15
A	CN 104364266 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2015年 2月 18日 (2015-02-18) 全文	1-15
A	WO 2015/200438 A1 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.) 2015年 12月 30日 (2015-12-30) 全文	1-15
A	WO 2014/107739 A1 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.) 2014年 7月 10日 (2014-07-10) 全文	1-15
A	CN 105461809 A (中山康方生物医药有限公司 等) 2016年 4月 6日 (2016-04-06) 全文	1-15
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 8月 3日		2017年 8月 22日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		靳春鹏
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62413803

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2017/087536			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102245641	A	2011年 11月 16日	AU	2014262171	B	2017年 1月 19日
				BR	PI0922885	A2	2016年 10月 4日
				US	2010166768	A1	2010年 7月 1日
				AU	2009333326	A1	2011年 6月 16日
				IN	201104213	P4	2012年 9月 7日
				JP	2013198487	A	2013年 10月 3日
				VN	10016280	B	2017年 1月 25日
				ES	2613489	T	2017年 5月 24日
				HK	1155180	A0	2012年 5月 11日
				NZ	601923	A	2013年 3月 28日
				KR	20150013359	A	2015年 2月 4日
				KR	1504494	B	2015年 3月 20日
				KR	20110094067	A	2011年 8月 19日
				KR	1699707B	B1	2017年 1月 25日
				ID	514885	A	2011年 11月 10日
				EP	2358756	B1	2017年 1月 11日
				EP	3156422	A2	2017年 4月 19日
				EP	3156422	A3	2017年 7月 5日
				EP	2358756	A1	2011年 8月 24日
				MX	341041	B	2016年 8月 5日
				CA	2747123	A1	2010年 7月 8日
				CN	104447997	A	2015年 3月 25日
				CN	102245641	B	2015年 1月 7日
				ZA	201103762	A	2012年 1月 25日
				JP	2012511913	A	2012年 5月 31日
				JP	5902122	B2	2016年 4月 13日
				JP	5318965	B2	2013年 10月 16日
				SG	171377	A1	2011年 6月 29日
				SG	171377	B	2015年 3月 11日
				IL	213050	A	2015年 1月 29日
				TW	I465249	B	2014年 12月 21日
				TW	201036633	A	2010年 10月 16日
				US	8062640	B2	2011年 11月 22日
				NZ	593155	A	2012年 11月 30日
				AU	2014262171	A1	2014年 11月 27日
				AU	2009333326	B	2015年 2月 26日
				AU	2009333326	B	2014年 9月 11日
				RU	2015109166	A	2015年 8月 10日
				RU	2552169	C2	2015年 6月 10日
				RU	2011129316	A	2013年 1月 20日
				PH	12011501005	B1	2015年 9月 10日
				MX	2011006197	A	2011年 7月 31日
				ID	201403095	A	2014年 8月 28日
				WO	2010077854	A1	2010年 7月 8日
				WO	2010077854	A8	2011年 7月 7日
				VN	28783	A	2012年 2月 27日
				MX	321431	B	2014年 6月 26日
CN	101939338	A	2011年 1月 5日	AU	2009212282	A1	2010年 8月 12日
				AU	2009212282	B	2014年 8月 21日
				JP	5514743	B2	2014年 6月 4日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2017/087536			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
				JP	2011512129	A	2011年 4月 21日
				US	2009232795	A1	2009年 9月 17日
				US	8957194	B2	2015年 2月 17日
				US	8188233	B2	2012年 5月 29日
				US	2013071379	A1	2013年 3月 21日
				TW	200938631	A	2009年 9月 16日
				EP	2245070	A1	2010年 11月 3日
				EP	2245070	B1	2014年 8月 6日
				CA	2711791	A1	2009年 8月 13日
				IN	201005424	P1	2011年 11月 18日
				WO	2009100318	A1	2009年 8月 13日
CN	104364266	A	2015年 2月 18日	AR	91462	A1	2015年 2月 4日
				MX	2014014830	A	2015年 5月 11日
				US	9266961	B2	2016年 2月 23日
				US	2013344085	A1	2013年 12月 26日
				US	2016355606	A1	2016年 12月 8日
				RU	2015101113	A	2016年 8月 10日
				HK	1205141	A0	2015年 12月 11日
				EP	2861624	A1	2015年 4月 22日
				JP	2015530867	A	2015年 10月 29日
				WO	2013188855	A1	2013年 12月 19日
				TW	201410706	A	2014年 3月 16日
				KR	20150023711	A	2015年 3月 5日
				CA	2875096	A1	2013年 12月 19日
WO	2015/200438	A1	2015年 12月 30日	无			
WO	2014/107739	A1	2014年 7月 10日	无			
CN	105461809	A	2016年 4月 6日	WO	2016127912	A1	2016年 8月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		P
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00		
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00		
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06		
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N	33/536	(2006.01)	G 0 1 N	33/536		D

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

专利名称(译)	长效PCSK9特异性结合蛋白及其应用		
公开(公告)号	JP2019527562A	公开(公告)日	2019-10-03
申请号	JP2019517134	申请日	2017-06-08
[标]发明人	王少雄		
发明人	王 少雄		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C07K16/40 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61P43/00 A61P3/00 A61P3/06 A61P9/00 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/40 C07K2317/565 C07K2317/76 A61K38/00 A61P3/06 A61K39/395 C12N9/6424 C12Y304/21061 G01N33/532 G01N33/6893 G01N2333/96433 G01N2800/04 G01N2800/324 G01N2800/7066 C07K2317/32 C07K2319/30 C12N15/62 G01N33/582 G01N33/583		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C07K16/40 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.P A61P43/00 A61P3/00 A61P3/06 A61P9/00 G01N33/53.D G01N33/536.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA55 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	201610405036.7 2016-06-08 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明提供了长效的PCSK9特异性结合蛋白及其应用。本发明提供了结合蛋白，其与包含独特的互补决定区的MV072蛋白特异性结合，即前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9型 (PCSK9)，其与PCSK9特异性结合。可以有效和有效地削弱PCSK9的功能，并可以降低血浆中的LDL胆固醇水平；此外，它还提供了结合蛋白在与PCSK9功能相关或受其影响的疾病的治疗中的应用。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2019-527562 (P2019-527562A) (43) 公表日 令和1年10月3日 (2019.10.3)
(5) Int. Cl.	FI	テーマコード (参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B064
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4B065
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	4C085
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4H045
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		
(2) 出願番号 特願2019-517134 (P2019-517134)	(7) 出願人 518435932	
(8) (2) 出願日 平成29年6月8日 (2017.6.8)	常州博嘉生物医▲薬▼科技有限公司	
(8) 翻訳文提出日 平成31年1月9日 (2019.1.9)	中華人民共和国213125江▲蘇▼省常州市新北区黄河西路268号809	
(8) 国際出願番号 PCT/CN2017/087536	(7) 代理人 110001070	
(8) 国際公開番号 W02017/211313	特許業務法人SSINPAT	
(8) 国際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)	(7) 発明者 王 少雄	
(3) 優先権主張番号 201610405036.7	中華人民共和国上海市浦▲東▼新区半夏路178号1幢4楼	
(3) 優先日 平成28年6月8日 (2016.6.8)	Fターム (参考) 4B064 AC27 CA10 CA19 CC24 DA01	
(3) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)	4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 CA24	
	CA25 CA44	
	4C085 AA13 AA14 BB22 DD62 EE01	
	4H045 AA11 AA30 BA10 DA55 DA76	
	EA28 FA74	
	最終頁に続く	
(5) 【発明の名称】 長時間作用性PCSK9特異的結合タンパク質及びその応用		